

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(19) 【発行国】 日本国特許庁 ( J P )

(12) 【公報種別】 公開特許公報 ( A )

(11) 【公開番号】 特開平 8 - 5 6 6 6 9

(43) 【公開日】 平成 8 年 ( 1 9 9 6 ) 3 月 5 日

(54) 【発明の名称】 新規シャトルベクタープラスミド

(51) 【国際特許分類第 6 版】

C12N 15/09 ZNA

// C12N 1/21 8828-4B

(C12N 15/09 ZNA

C12R 1:19 )

(C12N 15/09 ZNA

C12R 1:01 )

(C12N 1/21

C12R 1:01 )

【 F I 】

C12N 15/00 ZNA A 9281-4B

(C12N 15/00 ZNA A

C12R 1:19 )

(C12N 15/00 ZNA A

C12R 1:01 )

【審査請求】 未請求

【請求項の数】 4

【出願形態】 F D

【全頁数】 9

(21) 【出願番号】 特願平 6 - 2 1 6 6 1 1

(22) 【出願日】 平成 6 年 ( 1 9 9 4 ) 8 月 1 8 日

(71) 【出願人】

(19) [Publication Office] Japanese Patent Office (JP)

(12) [Kind of Document] Japan Unexamined Patent Publication (A)

(11) [Publication Number of Unexamined Application (A)] Japan Unexamined Patent Publication Hei 8-56669

(43) [Publication Date of Unexamined Application] 1996 (1996) March 5 day

(54) [Title of Invention] NOVEL SHUTTLE VECTOR PLASMID

(51) [International Patent Classification 6th Edition]

C12N 15/09 ZNA

// C12N 1/21 8828-4B

(C12N 15/09 ZNA

C12R 1: 19 )

(C12N 15/09 ZNA

C12R 1: 01 )

(C12N 1/21

C12R 1: 01 )

[FI]

C12N 15/00 ZNA A 928 1- 4B

(C12N 15/00 ZNA A

C12R 1: 19 )

(C12N 15/00 ZNA A

C12R 1: 01 )

[Request for Examination] Examination not requested

[Number of Claims] 4

[Form of Application] FD,

[Number of Pages in Document] 9

(21) [Application Number] Japan Patent Application Hei 6-216611

(22) [Application Date] 1994 (1994) August 18 day

(71) [Applicant]

【識別番号】 590000455

【氏名又は名称】 財団法人石油産業活性化センター

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門四丁目3番9号

(71) 【出願人】

【識別番号】 000231109

【氏名又は名称】 株式会社ジャパンエナジー

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門二丁目10番1号

(72) 【発明者】

【氏名】 佐伯 尚史

【住所又は居所】 埼玉県戸田市新曽南3丁目17番35号 株式会社ジャパンエナジー内

(74) 【代理人】

【弁理士】

(57) 【要約】

【構成】 次のDNA領域をもち、大腸菌及びロトコッカス(Rhodococcus) 属に属する菌株のいずれの細胞内でも複製可能なシャトルベクタープラスミド。

(A) ロドコッカス属菌株の細胞内で複製増殖可能なDNA領域。

(B) 大腸菌の細胞内で複製増殖可能なDNA領域。

(C) 薬剤耐性遺伝子を含むDNA領域。

(A) は、ノカルディオフォルム細菌に属する菌株由来のプラスミド pNC 500またはpNC 903 に含有されるDNA領域が用いられる。

【効果】 大腸菌及びロトコッカス属細菌内のいずれにおいても複製可能であって、工業的に利用し得る微生物の育種改良に用いることができる。特に、プラスミド pNC500 または pNC903 の制限酵素による開裂部位を利用して、外来DNA断片を導入修飾し、多くの有用なプラスミドベクターの開発に利用することができる。

[Applicant Code] 590000455

[Name] PETROLEUM ENERGY CENTER

[Address] Tokyo Minato-ku Toranomon 4-3-9

(71) [Applicant]

[Applicant Code] 0002 31 109

[Name] JAPAN ENERGY CORPORATION (DB 69-056-8118)

[Address] Tokyo Minato-ku Toranomon 2-10-1

(72) [Inventor]

[Name] Saei Naofumi

[Address] Inside of Saitama Prefecture Toda City Niizo Minami 3-17-35 Japan Energy Corporation (DB 69-056-8118)

(74) [Attorney(s) Representing All Applicants]

[Patent Attorney]

(57) [Abstract]

[Constitution] With following DNA region, with no intracellular of strain which belongs to the E. coli and Ro jp7 コッ deposit (Rhodococcus) being attached replicatable shuttle vector plasmid.

(A) With intracellular of Rhodococcus sp. strain duplication growable DNA region.

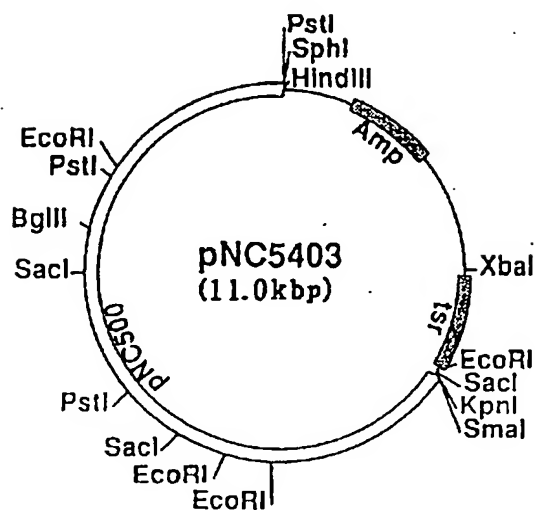
(B) With intracellular of E. coli duplication growable DNA region.

(C) DNA region which includes chemical resistance gene.

As for (A), it can use DNA region which is contained in plasmid pNC 500 or the pNC 903 of strain derivation which belongs to no cult D. off おjp11 Δ bacteria.

[Effect(s)] Being a replicatable in which inside E. coli and Ro jp7 コッ deposit being attached bacteria, you can use for breeding improvement of the microorganism which it can utilize in industrially. Especially, making use of cleavage site due to restriction enzyme of plasmid pNC500 or the pNC903, it can introduce can decorate imported DNA fragment, can utilize in

development of many useful plasmid vector.



#### 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 大腸菌及びロドコッカス (*Rhodococcus*) 属に属する菌株の何れの細胞内でも複製可能なシャトルベクタープラスミドであり、(A) ノカルディオフォルム細菌に属する菌株由来のプラスミド pNC500 或いは pNC903 から選ばれる一つのプラスミドに含有され、且つ *Rhodococcus* 属に属する細菌株の細胞内で複製増殖可能な DNA 領域と、(B) 大腸菌の細胞内で複製増殖可能な DNA 領域と、(C) 薬剤耐性遺伝子を含む DNA 領域とを含有することを特徴とするプラスミド。

【請求項 2】 (B) 大腸菌の細胞内で複製増殖可能な DNA 領域が、環状プラスミド pHSG299、pHSG298、pUC18 及び pUC19 よりなる群より選択される一つのプラスミドに含有され、且つ該プラスミドの複製開始点を含む DNA 領域であることを特徴とする請求項 1 に記載のプラスミド。

【請求項 3】 分子量が約 11.0 kbp であり且つ制限酵素開裂地図 (図 1) で示されるプラスミド pNC5403。

【請求項 4】 分子量が約 6.3 kbp であり且つ制限酵素開裂地図 (図 2) で示されるプラスミド pNC9501。

#### 【発明の詳細な説明】

【0001】

#### [Claim(s)]

[Claim 1] Being a replicatable shuttle vector plasmid any intracellular of strain which belongs to *E. coli* and *Rhodococcus* (*Rhodococcus*) being attached to be, plasmid which designates that with intracellular of bacteria strain which is contained in plasmid of one which is chosen from plasmid pNC500 or the pNC903 of strain derivation which belongs to (A) no cult D. off *jp11*  $\Delta$  bacteria belongs to and *Rhodococcus* being attached the duplication growable DNA region and DNA region which includes (C) drug resistance gene are contained with intracellular of duplication growable DNA region and (B) *E. coli* as feature.

[Claim 2] (B) Plasmid which is stated in Claim 1 which designates that it is a DNA region where with intracellular of *E. coli* duplication growable DNA region, from the group which consists of ring shape plasmid pHSG299, pHSG298, pUC18 and the pUC19 is contained in plasmid of one which is selected includes replication start of and said plasmid as feature.

[Claim 3] Molecular weight is approximately 11.0 kbp and plasmid pNC5403 which is shown with the restriction enzyme cleavage map (Figure 1).

[Claim 4] Molecular weight is approximately 6.3 kbp and plasmid pNC9501 which is shown with the restriction enzyme cleavage map (Figure 2).

#### [Description of the Invention]

[0001]

【産業上の利用分野】本発明は、大腸菌及びRhodococcus 属に属する菌株の何れの細胞内でも複製可能な新規シャトルベクタープラスミドに関する。更に詳しくは、ノカルディオフォルム細菌に属する菌株由来のプラスミドpNC500又はpNC903に含まれ、Rhodococcus属に属する菌株の細胞内で複製可能なDNA領域を含有するDNA断片及び、大腸菌の細胞内で複製可能なDNA領域を含有するDNA断片を含んでなるシャトルベクタープラスミドに関する。

## 【0002】

【従来の技術】従来、土壤中より分離したノカルディア属、ロドコッカス属などのノカルディオフォルム細菌がオレフィンを酸化して、対応するエポキシド類を生産することが知られている。例えば、土壤中より分離したノカルディア・コラリーナは、プロピレンを炭素源として光学活性エポキシドあるいはトリフルオロプロペンオキシド (TFPO) の生産などに利用されている。これらの化合物は、合成樹脂、医薬、農業などの有機化学製品の製造原料中間体として広範囲に用いられている。これらの土壤中より分離したノカルディオフォルム細菌を用い、更なる菌株改良のため、エポキシド生産能を有するノカルディオフォルム細菌の宿主ベクター系の開発が以前から期待されていた。これらの微生物を宿主とするのに適したベクターの開発はあまりみられない。本発明者らは、既にノカルディオフォルム細菌に分類されるエポキシド生産株より見いだした、ノカルディオフォルム細菌の宿主ベクター系に適用可能な2種類のプラスミド、即ち *Nocardia corallina* (ノカルディア・コラリーナ) B-276 (FERM P-4094) 由来のプラスミド pNC500 (特開平5-244953 号公報を参照) 及び *Rhodococcus rhodochrous* P-II-123-1 (FERM P-14193) 由来のプラスミド pNC903 (特願平6-73795 号明細書を参照) を特許出願した。また、ロドコッカス属の一部を宿主とする、宿主ベクター系の開発例として、ジャーナル オブ バクテリオロジー (J. Bacteriol.) 170, 638 (1988)、アプライド アンド エンバイロメンタル マイクロバイオロジー (Appl. Environ. Microbiol.) 56, 2818 (1990)、プラスミド (Plasmid) 23, 242 (1990) 等に数例が報告されているにすぎない。

【0003】しかしながら、前記するプラスミド pNC500 並びに pNC903 を除き、従来より報告されているノカルディオフォルム細菌由来のプラスミドの多くは、ロドコッカス属の一部のみを宿主にすることができるにすぎないものであった。そのた

[Field of Industrial Application] This invention regards replicatable novel shuttle vector plasmid any intracellular of strain which belongs to the *E. coli* and *Rhodococcus* being attached. Furthermore details are included by plasmid pNC500 or pNC903 of the strain derivation which belongs to no cull D. off 〇 jp11  $\Delta$  bacteria, including DNA fragment which contains replicatable DNA region with intracellular of the DNA fragment and *E. coli* which contain replicatable DNA region with intracellular of the strain which belongs to *Rhodococcus* being attached, regard shuttle vector plasmid which becomes.

## [0002]

[Prior Art] Until recently, *Nocardiaceae* and *Rhodococcus* sp. or other no cull D. off 〇 jp11  $\Delta$  bacteria which are separated from in soil oxidation doing olefin, it is known that epoxide which correspond are produced. *Nocardia* \* コラリーナ which is separated from in for example soil is utilized in production etc of optical activity epoxide or trifluoro propene oxide (TFPO) with propylene as the carbon source. These compound are used for broad range as process raw material intermediate of synthetic resin, the pharmaceutical and agriculture or other organic chemical product. Making use of no cull D. off 〇 jp11  $\Delta$  bacteria which is separated from in soil of these, for strain improvement on that of development of host-vector system of no cull D. off 〇 jp11  $\Delta$  bacteria which possesses epoxide production ability was expected from time before. Development of vector which is suited in order to designate the semi-organism as host is not excessively seen. You discovered these inventors, from epoxide producing strain which already is classified into no cull D. off 〇 jp11  $\Delta$  bacteria, plasmid of applicable 2 kinds, namely the plasmid pNC500 (Japan Unexamined Patent Publication Hei 5-244953 disclosure reference) of *Nocardia corallina* (*Nocardia* \* コラリーナ) B-276 (FERM P-4094) derivation and plasmid pNC903 (Japan Patent Application Hei 6-73795 specification reference) of *Rhodococcus rhodochrous* P-II-123-1 (FERM P-14193) derivation patent application were done in host-vector system of no cull D. off 〇 jp11  $\Delta$  bacteria. In addition, portion of *Rhodococcus* sp. is designated as host, these several examples only is reported to journal of bacteriology (Journal of Bacteriology (0021-9193, JOBAAY) 170, 638 (1988), Applied and en bi- Ro mentha jp11 microbiology (Applied and Environmental Microbiology (0099-2240, AEMIDF)) 56, 2818 (1990) and the plasmid (Plasmid) 23, 242 (1990) etc as development example of host-vector system

[0003] But, many of plasmid of no cull D. off 〇 jp11  $\Delta$  bacteria derivation which is reported from until recently excluding plasmid pNC500 and the pNC903 which description above are done, only can designate

め、より広い範囲のノカルディオフォルム細菌を宿主として適用でき、宿主のエポキシド生産菌から、微生物を育種、改良するために利用できる新しいベクタープラスミドの開発が強く要望されている。特に、ノカルディオフォルム細菌を宿主として適用できるばかりではなく、大腸菌をも宿主として適用できるベクタープラスミド、即ちノカルディオフォルム細菌と大腸菌の何れの細胞内でもその複製が行われる大腸菌-ノカルディオフォルム細菌のシャトルベクタープラスミドとして有用な環状のベクタープラスミドの開発が強く要望されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記課題を解決しようとするものである。すなわち、本発明の目的は、ノカルディオフォルム細菌を宿主として適用できるばかりではなく、大腸菌をも宿主として適用できる新規なベクタープラスミド、即ちノカルディオフォルム細菌と大腸菌の何れの細胞内でもその複製が行われる新規な環状シャトルベクタープラスミドを提供することにある。特に、大腸菌とノカルディオフォルム細菌である *Rhodococcus* 属に属する菌株との間のシャトルベクタープラスミドとして用いられる新規な環状のプラスミドを提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、ノカルディオフォルム細菌を宿主とすることができ、DNA組換えに使用可能な新規プラスミドを開発すべく鋭意研究を行い、本発明者らが既に見出し、特許出願した、上記する2種類のプラスミド、即ち プラスミド pNC500 及び プラスミド pNC903 を用いて、新規な環状プラスミドを創製し、それを大腸菌及びロドコッカス属に属する微生物の細胞内に導入し、得られた細菌を培養したところ、何れの宿主においても当該環状プラスミドが複製されることを見出し、本発明を完成した。

【0006】本発明のプラスミドは、次の (A) ~ (C) の DNA 領域を含有し、大腸菌及びロドコッカス (*Rhodococcus*) 属に属する菌株の何れの細胞内でも複製可能なシャトルベクタープラスミドである。

(A) ノカルディオフォルム細菌に属する菌株由来のプラスミド pNC500 或いは pNC903 から選ばれる一つのプラスミドに含有され、且つ *Rhodococcus* 属に属する細菌株の細胞内で複製増殖可能な DNA 領域、(B) 大腸菌の細胞内で複製増殖可能な

only the portion of *Rhodococcus* sp. as host, it was something. Because of that, be able to apply no cull D. off  $\Delta$  bacteria, of a wider range, as host from epoxide producing microbe of host, breeding, to improve can utilize microorganism development of new vector plasmid is strongly demanded in order. Especially, it keeps being able to apply no cull D. off  $\Delta$  bacteria as host, development of vector plasmid of useful cyclic is strongly demanded as host also *E. coli* as shuttle vector plasmid of *E. coli* - no cull D. off  $\Delta$  bacteria where duplication is done vector plasmid namely the no cull D. off  $\Delta$  bacteria and any intracellular of *E. coli* which it can apply.

[0004]

[Problems to be Solved by the Invention] This invention is something which it tries to solve above-mentioned problem. objective of namely, this invention it keeps being able to apply no cull D. off  $\Delta$  bacteria as host can apply also *E. coli* is to offer the novel cyclic shuttle vector plasmid where duplication is done novel vector plasmid namely no cull D. off  $\Delta$  bacteria and any intracellular of *E. coli* which as host. Especially, it is to offer plasmid of novel cyclic which is used as the shuttle vector plasmid with *E. coli* and strain which belongs to *Rhodococcus* being attached which is a no cull D. off  $\Delta$  bacteria.

[0005]

[Means to Solve the Problems] As for these inventors, Thing which designates no cull D. off  $\Delta$  bacteria as host to do, In order that useable novel plasmid is developed in DNA rearrangement, diligent research to do, these inventors already to discover, patent application it did, new preparation it did novel ring shape plasmid making use of plasmid, namely plasmid pNC500 and plasmid pNC903 of 2 kinds which description above is done, that it introduced into intracellular of microorganism which belongs to the *E. coli* and *Rhodococcus* sp., when bacteria which is acquired was cultured, it discovered fact that this said ring shape plasmid is duplicated regarding whichever host completed this invention.

[0006] It is a replicatable shuttle vector plasmid any intracellular of strain where plasmid of this invention contains DNA region of next (A) to (C), belongs to *E. coli* and *Rhodococcus* (*Rhodococcus*) being attached.

(A) It is contained in plasmid of one which is chosen from the plasmid pNC500 or pNC903 of strain derivation which belongs to no cull D. off  $\Delta$  bacteria with intracellular of bacteria strain which

## DNA領域、(C) 薬剤耐性遺伝子を含むDNA領域

【0007】本発明のプラスミドに含まれる、(A) ノカルディオフォルム細菌に属する菌株由来のプラスミド pNC500 或いは pNC903 から選ばれる一つのプラスミドに含有され、且つ *Rhodococcus* 属に属する細菌株の細胞内で複製増殖可能な DNA 領域は、当該プラスミドから制限酵素により切り出される DNA 断片であり、少なくとも *Rhodococcus* 属に属する菌株細胞内で複製増殖に必要なレプリコン領域を含むならば、該プラスミドの全体であってもよく、或いは一断片であってもよい。なお、該プラスミド pNC500 は、*Nocardia corallina* B-276 (FERM P-4094) 株由来のプラスミドであり (特開 平 5-244953 号公報を参照)、又プラスミド pNC903 は、*Rhodococcus rhodochrous* P-II-123-1 (FERM P-14193) 株由来のプラスミドであり、その制限酵素地図を図 3 及び図 4 に示す。なお、プラスミド pNC500 を保持する *Nocardia corallina* B-276 (FERM P-4094) 株は、工業技術院生命工学工業技術研究所に、受託番号 FERM P-4094 として、またプラスミド pNC903 を保持する *Rhodococcus rhodochrous* P-II-123-1 (FERM P-14193) 株は、受託番号 FERM P-14193 として、それぞれ寄託されている。

【0008】また、本発明のプラスミドに含まれる、(B) 大腸菌の細胞内で複製増殖可能な DNA 領域とは、大腸菌内で複製増殖し得る環状プラスミドに含まれ、当該プラスミドから制限酵素により切り出される DNA 断片であり、該環状プラスミドの複製開始点として作用する (ORI) DNA 領域を包含する DNA 断片であるならば、該プラスミドの全体であってもよく、或いは一断片であってもよい。なお、大腸菌内で複製増殖し得る環状プラスミドとして、プラスミド pHSG298, pHSG299, pUC18, pUC19 等を公知のものとして例示できる。これら公知のプラスミドにある複製開始点として作用する DNA 領域 (ORI) は、例えば、プラスミド pHSG299 においては、該プラスミドの制限酵素地図 (図 5) 上において ORI と記す部分であり、既に報告されている文献により特定できる。なお、プラスミド pHSG298, pHSG299, pUC18 及び pUC19 の制限酵素地図を、図 5 及び図 6 にそれぞれ示す。なお、これらの図では、大腸菌内でのマーカーとして公知の薬剤耐性遺伝子の位置も併せて示す。

belongs to the and *Rhodococcus* being attached duplication growable DNA region, the duplication growable DNA region, it includes (C) drug resistance gene with intracellular of (B) *E. coli* DNA region

[0007] In plasmid of this invention it is included, It is contained in plasmid of one which is chosen from the plasmid pNC500 or pNC903 of strain derivation which belongs to (A) *Nocul D. off* *jp11*  $\Delta$  bacteria, replicon region where duplication growable DNA region is DNA fragment which is quarried out from this said plasmid by restriction enzyme with intracellular of bacteria strain which belongs to and *Rhodococcus* being attached is necessary for duplication multiplication with strain intracellular which at least belongs to *Rhodococcus* being attached is included, if is, it is possible to be a entirety of said plasmid, or to be one fragment is possible. Furthermore, said plasmid pNC500 is plasmid of *Nocardia corallina* B-276 (FERM P-4094) strain derivation and the (Japan Unexamined Patent Publication Hei 5-244953 disclosure reference), in addition plasmid pNC903 is plasmid of *Rhodococcus rhodochrous* P-II-123-1 (FERM P-14193) strain derivation, the restriction enzyme map is shown in Figure 3 and Figure 4. Furthermore, as for *Nocardia corallina* B-276 (FERM P-4094) strain which keeps plasmid pNC500, in the Agency of Industrial Science and Technology National Institute of Bioscience and Human-Technology, as for *Rhodococcus rhodochrous* P-II-123-1 (FERM P-14193) strain which in addition keeps plasmid pNC903 as the deposit number FERM P-4094, deposit it is done respectively as deposit number FERM P-14193.

[0008] In addition, In plasmid of this invention it is included, Duplication growable DNA region, it is included by ring shape plasmid which it can to duplicate multiply inside *E. coli* and with intracellular of (B) *E. coli*, it is a DNA fragment which is quarried out from this said plasmid by restriction enzyme it is a DNA fragment which includes (ORI) DNA region which operates as replication start of said ring shape plasmid, if is, it is possible to be a entirety of said plasmid, or to be one fragment is possible. Furthermore, as ring shape plasmid which it can to duplicate multiply inside *E. coli* and, it can illustrate plasmid pHSG298, pHSG299, pUC18, pUC19 etc as those of the public knowledge. DNA region (ORI) which operates as replication start which is in plasmid of these public knowledge ORI is portion which is inscribed regarding for example plasmid pHSG299, in on restriction enzyme map (Figure 5) of said plasmid, specific it is possible with literature which is already reported. Furthermore, restriction enzyme map of plasmid pHSG298, pHSG299, pUC18 and pUC19, is shown respectively in Figure 5 and Figure 6. Furthermore, in these figures, it shows inside *E. coli* also position of drug resistance

【0009】更に、(C) 薬剤耐性遺伝子を含むDNA領域は、宿主とする *Rhodococcus* 属に属する細菌或は大腸菌内で発現し、宿主に薬剤耐性を与えることができる薬剤耐性遺伝子を含むDNA断片であり、例えば、大腸菌内でのマーカーとして公知の薬剤耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子などの大腸菌由来の薬剤耐性遺伝子を含むDNA断片、或は *Rhodococcus* 属細菌内でのマーカーとして公知の薬剤耐性遺伝子、チオストレプトン耐性遺伝子などのノカルディオフォルム細菌並びにその近縁関係にある放線菌等に由来の薬剤耐性遺伝子を含むDNA断片などを例示することができる。特に、上記の大腸菌内で複製増殖し得る環状プラスミドに遺伝子組換え技術により導入し、当該薬剤耐性を示す大腸菌に形質転換できる大腸菌由来の薬剤耐性遺伝子、及び該プラスミド pNC500 或いは pNC903 に遺伝子組換え技術により導入し、当該薬剤耐性を示す *Rhodococcus* 属に属する細菌株に形質転換できるノカルディオフォルム細菌並びにその近縁関係にある放線菌等に由来の薬剤耐性遺伝子は好適に用いられる。更には、*Rhodococcus* 属に属する細菌及び大腸菌の両属間において、薬剤耐性により、菌体内にプラスミドの存在が示唆される限り、薬剤の種類は例示するものに限られるものではなく、また薬剤耐性遺伝子を含むDNA領域は一種類でも複数存在していても良い。

【0010】なお、(C) 薬剤耐性遺伝子を含むDNA領域として、大腸菌由来の薬剤耐性遺伝子を含むDNA断片と *Rhodococcus* 属細菌内でのマーカーとして公知の薬剤耐性遺伝子を含むDNA断片とをともに含有させることにより、大腸菌由来の薬剤耐性遺伝子に起因する薬剤耐性の有無により、当該プラスミドが大腸菌の菌体内に存在することを、又 *Rhodococcus* 属細菌内でのマーカーとして公知の薬剤耐性遺伝子に起因する薬剤耐性の有無により、当該プラスミドが *Rhodococcus* 属細菌の菌体内に存在することを、それぞれ識別することができ、より好ましいプラスミドとなる。

gene of public knowledge together as marker.

[0009] Furthermore, Includes (C) drug resistance gene as for DNA region which, It reveals inside bacteria or *E. coli* which belongs to *Rhodococcus* being attached which is made host, Being a DNA fragment which includes drug resistance gene which can give drug resistance to the host to be, drug resistance gene of public knowledge, inside DNA fragment or *Rhodococcus* being attached bacteria which includes drug resistance gene of kanamycin resistance gene, ampicillin resistance gene and chloramphenicol resistance gene or other *E. coli* derivation drug resistance gene of public knowledge, it is possible as marker inside the for example *E. coli* as marker to illustrate DNA fragment etc which includes the drug resistance gene of derivation in this pick-up plasmid resistance gene or other no cult. off *E. coli* bacteria and Actinomycetes etc which is close relationship. Especially, It introduces into ring shape plasmid which it can to duplicate multiply inside the *E. coli* which description above is done due to gene recombination technology, drug resistance gene of *E. coli* derivation which neoplastic transformation it is possible in the *E. coli* showing this said drug resistance, it introduces into and the said plasmid pNC500 or pNC903 due to gene recombination technology, drug resistance gene of derivation is used for ideal for no cult. off *E. coli* bacteria which neoplastic transformation it is possible in bacteria strain which belongs to *Rhodococcus* being attached which shows this said drug resistance and Actinomycetes etc which is in close relationship. Furthermore, if existence of plasmid is suggested inside fungus body both of bacteria and *E. coli* which belong to *Rhodococcus* being attached in, by drug resistance intergeneric, types of drug is not something which is limited to those which are illustrated, the DNA region which in addition includes drug resistance gene is good existing multiple even with one kind.

[0010] Furthermore, DNA region which includes (C) drug resistance gene doing. In containing with DNA fragment which includes drug resistance gene of *E. coli* derivation and DNA fragment which includes inside *Rhodococcus* being attached bacteria drug resistance gene of public knowledge as marker together to depend, In presence or absence of drug resistance which originates in drug resistance gene of *E. coli* derivation to depend, this said plasmid existing inside fungus body of *E. coli*, in addition inside *Rhodococcus* being attached bacteria it is possible, becomes a more desirable plasmid to identify fact that this said plasmid exists inside the fungus body of *Rhodococcus* being attached bacteria with presence or absence of the drug resistance which originates in drug resistance gene of public knowledge as marker, respectively.



【0011】本発明のプラスミドは、例えば、以下の手段により構築することができる。先ず、当該プラスミド pNC500 の制限酵素開裂地図（図3）或いは pNC903 の制限酵素開裂地図（図4）を参照して、該プラスミドに単一の切断部位数を有する制限酵素、例えば、プラスミド pNC500 においては制限酵素 BamHI、又プラスミド pNC903 においては制限酵素 ClaI を用いて、当該環状プラスミドを開裂する。得られる単一のDNA断片を1.0%アガロースゲル電気泳動等の方法を用いて単離、精製する。このDNA断片は、(A)ノカルディオフォルム細菌に属する菌株由来のプラスミド pNC500 或いは pNC903 から選ばれるプラスミドに含有され、且つRhodococcus 属に属する細菌株の細胞内で複製増殖可能なDNA領域を含有する。

【0012】また、大腸菌内で複製増殖し得るプラスミドpHSG298, pHSG299, pUC18, pUC19などを、これらのプラスミドに単一の切断部位数を有する制限酵素、例えばプラスミド pUC18及び pUC19においては、制限酵素 Hinc IIを用いてまた、プラスミド pHSG298及びpHSG299, においては制限酵素 AccI を用いてプラスミドを開裂し、アルカリホスファターゼと反応させた後単離精製して、複製開始点(ORI) DNAを包含するDNA断片を得る。次に、このようにして得られたRhodococcus 属に属する菌株の細胞内で複製増殖可能なDNA領域と、大腸菌の細胞内で複製増殖可能なDNA領域とを連結する。連結は通常、市販のライゲーションキットを用いることによって容易に行なうことができる。得られた連結DNAを大腸菌のコピテントセル中に導入して培養し、大量に複製する。

【0013】このようにして得られたプラスミドから所定のRhodococcus 属に属する細菌株の細胞内で増殖可能なDNA領域と、大腸菌の細胞内で複製増殖可能なDNA領域とを含むDNA断片を制限酵素で切断して採取し、単離精製する。単離精製は通常、アガロースゲル電気泳動にかけ、所定の分子量のバンドを切り出し、これを溶出し、フェノールクロロホルム処理、エタノール沈澱等を行なうことによって行なわれる。一方、薬剤耐性遺伝子を含むDNA断片は、前記したような種々の薬剤耐性遺伝子を含むDNA断片が用いられる。例えば、テオストレプトン耐性遺伝子を用いようとする場合、プラスミドpIJ702 [E.Kats, Journal of General Microbiology, 129, 2703-2714(1983)] を保持する Streptomyces Lividans TK-24 を培養し、得られる菌体を溶菌してDNA断片を採取し、このなかからテオストレプトン耐性遺伝子を含むDNA断片を単離精製し、これをサブクローニングする。このようにして得られたプラスミドから所定の断片を制限酵素で切断して採取し、単離精製する。単離精製は、通常、アガロースゲル電気泳動にかけ、所定のバンドを切り出しこれを溶出し、フェノールクロ

[0011] It can construct plasmid of this invention, with means below the for example. First, referring to restriction enzyme cleavage map (Figure 3) of this said plasmid pNC500 or restriction enzyme cleavage map (Figure 4) of pNC903, the cleavage it does this said cyclic plasmid making use of restriction enzyme ClaI restriction enzyme BamHI, in addition regarding plasmid pNC903 regarding restriction enzyme and for example plasmid pNC500 which possess quantity of single cleavage site in said plasmid. making use of 1.0% agarose gel electrophoresis or other method it isolates and refines single DNA fragment which is acquired. This DNA fragment is contained in plasmid which is chosen from plasmid pNC500 or the pNC903 of strain derivation which belongs to (A) no cull D. off jp11 bacteria contains duplication growable DNA region with intracellular of the bacteria strain which belongs to and Rhodococcus being attached.

[0012] In addition, plasmid pH SG298, pHSG299, pUC18, pUC19 etc which it can to duplicate multiply inside the E. coli and, regarding restriction enzyme, for example plasmid pUC18 and pUC19 which possess quantity of single cleavage site in these plasmid, making use of restriction enzyme Hinc II and, cleavage it does plasmid making use of restriction enzyme AccI regarding the plasmid pH SG298, and pHSG299, after alkaline phosphatase and reaction isolation and purification does, it obtains DNA fragment which includes replication start (ORI) DNA. Next, with intracellular of strain which belongs to Rhodococcus being attached which it acquires in this way it connects with the duplication growable DNA region and duplication growable DNA region with intracellular of the E. coli. Usually, to do easily by using commercial ligation kit it is possible connection. introducing connected DNA which is acquired in the combination tent cell of E. coli, it cultures, duplicates in large scale.

[0013] Cutting off DNA fragment which with intracellular of bacteria strain which from the plasmid which it acquires in this way belongs to specified Rhodococcus being attached includes with growable DNA region and duplication growable DNA region with intracellular of the E. coli with restriction enzyme, it recovers, isolation and purification does. Usually, you apply isolation and purification on agarose gel electrophoresis, cut band of specified molecular weight, liquefy this, you are done by phenol chloroform treating and ethanol precipitation etc. On one hand, as for DNA fragment which includes drug resistance gene, before it cause DNA fragment which includes kind of various drug resistance gene which was inscribed. When it tries to use for example thio S pick-up ton resistance gene, it cultures the Streptomyces Lividans TK-24 which keeps plasmid pIJ 702 (E.Kats, Journal of general

ロホルム処理、エタノール沈澱等を行なう。

【0014】次に、前記したRhodococcus 属に属する細菌株の細胞内で増殖可能なDNA領域と、大腸菌の細胞内で複製増殖可能なDNA領域とを含むDNA断片と薬剤耐性遺伝子を含むDNA断片とを連結する。この連結は、通常、市販のライゲーションキットを用いることによって容易に行なうことができる。このようにして得られたプラスミドは、大腸菌のコンピテントセル中に導入して大量に複製する。本発明のこのようにして得られたプラスミドにはプラスミド pWC 5403、プラスミド pNE 9501等がある。これらのプラスミドでRhodococcus 属細菌を形質転換し増殖させ、薬剤耐性培地で培養し、生育する菌株からプラスミドを回収し、精製を行って、これらのプラスミドの存在を確認することができる。本発明のプラスミド pNC 5403 をRhodococcus rhodochrous に組込んだ組換え体は、受託番号 FERM P-14322 として、またプラスミド pNC 9501 を組込んだ組換え体は、受託番号 FERM P-14323 として工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

【0015】次に、本発明を実施例により具体的に説明する。なお、下記の実施例は本発明の技術的範囲を限定するものではない。

#### 【実施例 1】

##### ベクタープラスミド pNC5403 の構築

##### (1) プラスミド pNC500 の大腸菌由来のベクター pUC18 へのクローニング

プラスミド pNC500 (1 µg) に制限酵素 BamHI (5 units) を加え、37 °C、2 時間反応させた。これを、1.0% アガロースゲル電気泳動 (100V、2 時間) にかき、約 7.2 kbp のバンドを切り出した。この際、サイズマーカーとしてラムダファージ DNA の HindIII 消化物を用い、DNA 断片の分子量を算出した。切り出したゲルから、分子量約 7.2 kbp の DNA 断片を電気的に溶出し、フェノール-クロロホルム処理、エタノール沈澱して精製した後、TE 緩衝液 [0.025M トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (トリス)、0.025M EDTA : pH 8.0] に溶解した。更に、得られる pNC500 BamHI 切断 DNA の両末端を Takara Blunting

Microbiology, 129, 2703-2714(1983)), lysis it does the fungus body which is acquired and DNA fragment recovers, isolation and purification it does DNA fragment which from among these includes this pick-up  $\beta$ -ton resistance gene, subcloning does this. From plasmid which it acquires in this way cutting off specified fragment with restriction enzyme, it recovers, isolation and purification does. usually, you apply isolation and purification, on agarose gel electrophoresis, cut specified band and liquate this, phenol chloroform treat and ethanol precipitation etc.

[0014] Next, before it connects with growable DNA region which duplication growable DNA region includes with intracellular of E. coli and DNA fragment and DNA fragment which includes drug resistance gene with intracellular of bacteria strain which belongs to the Rhodococcus being attached which was inscribed. To do easily usually, by using commercial ligation kit it is possible this connection. Introducing in competent cell of E. coli, it duplicates plasmid which it acquires in this way, in large scale. There is a plasmid pWC 5403, plasmid pNE 9501 etc in plasmid which it acquires in this way of the this invention. neoplastic transformation it does Rhodococcus being attached bacteria with these plasmid and multiplies, cultures with drug resistance culture medium, plasmid it recovers from the strain which is grown, refines, verifies existence of these plasmid. As for recombinant which installs plasmid pNC 5403 of this invention in Rhodococcus rhodochrous, as for recombinant which in addition installs plasmid pNC 9501 as deposit number FERM P-14322, the deposit it is done in Agency of Industrial Science and Technology National Institute of Bioscience and Human-Technology as deposit number FERM P-14323.

[0015] Next, this invention is explained concretely with Working Example. Furthermore, below-mentioned Working Example is not something which limits technological range of this invention.

#### [Working Example 1]

##### Construction of vector plasmid pNC5403

##### (1) Cloning to vector pUC18 of E. coli derivation of plasmid pNC500

37 °C, 2 time it reacted to plasmid pNC500 (1 g) including restriction enzyme BamHI (5 units). You applied this, on 1.0% agarose gel electrophoresis (100V and 2 hours), started cutting band of approximately 7.2 kbp. In this case, molecular weight of DNA fragment was calculated making use of the HindIII digest of lambda phage DNA as size marker. from gel which is cut, it liquated DNA fragment of the molecular weight approximately 7.2 kbp in electrical, phenol-chloroform treatment and the ethanol

Kit を用いて平滑末端化した。

【0016】一方、大腸菌由来のベクターpUC18 0.5  $\mu$ g を制限酵素HincII (5units) と、37°C、2時間反応させ該プラスミドDNAを切断した。この反応液1容に1M Tris-HCl (pH8.0) を1/10容加え、アルカリホスファターゼ(1unit) と65°C、1時間反応させた。この溶液をフェノールクロロホルム処理し、エタノール沈殿してDNA断片を回収し、TE緩衝液に溶解した。

【0017】上記するpNC500のDNA断片を含む液とpUC18のDNA断片を含む液を、各1容ずつ混合し、このDNA溶液に8容のTakara ligation kit A液を加え、良く攪拌した。さらにこのDNA溶液に、10容のTakara ligation kit B液を追加し、16°C、30分間インキュベートした。

【0018】大腸菌 JM109株のコンピテントセル (TOYOBO製) に前記DNA溶液を加え、0°C、1時間静置後、42°C、2分間の熱処理を行い、SOC培地〔トリプトン 2%、酵母エキス 0.5%、0.025M NaCl、0.0025 KCl、0.01M MgSO<sub>4</sub>、0.01M MgCl<sub>2</sub>、0.02Mグルコース：pH7.4〕を加えて37°C、1時間振とうした。得られた大腸菌を、50  $\mu$ g/ml アンピシリン、1mM IPTG (イソプロピル- $\beta$ -ガラクトピラノシド)、および0.02% X-gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド) を含むLB培地(10% トリプトン、5% 酵母エキス、10% NaCl：pH8.0)に塗布し、37°C、1夜静置培養した。出現した白色コロニーよりプラスミドを調製し、制限酵素開裂地図を解析することにより目的のプラスミドを保持しているコロニーをスクリーニングした。スクリーニングしたコロニーを300mlのLB液体培地(50  $\mu$ g/ml アンピシリン含有)で培養し、プラスミドDNAをSDS-アルカリ法により大量調製した。

#### 【0019】(2) XbaI-KpnI 断片の調製

前記(1)で調製したプラスミド(1  $\mu$ g)に制限酵素XbaI及びKpnI (各5units)を加え、37°C、2時間反応させプラスミドDNAを切断した。このDNA断片を含む液を、1.0%アガロースゲル電気泳動(100V、2時間)にかけ、約9.9kbpのバンドを切り出した。この際、サイズマーカーとしてラムダファージDNAのHindIII消化物を用い、DNA断片の分子量を算出した

precipitation did and after refining, it melted in TE buffer (0.025M tris (hydroxymethyl) aminomethane (tris) and 0.025 MED TA: pH 8.0). Furthermore, both ends of pNC500 BamHI cutting DNA which is acquired blunting was done making use of Takara Blunting Kit.

[0016] On one hand, vector pUC18 0.5 g of E. coli derivation restriction enzyme HincII (5units) and 37 °C and the 2 hours reacting, it cut off said plasmid DNA 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 1/10 permitting/inserting adding, alkaline phosphatase (1unit) and the 65 °C and 1 hour it reacted in this reaction mixture 1 permitting/inserting, phenol - chloroform it treated this solution, ethanol precipitation did and DNA fragment recovered, in TE buffer melted.

[0017] At a time each 1 permitting/inserting it mixed liquid which includes DNA fragment of pNC500 which description above is done and the liquid which includes DNA fragment of pUC18, it agitated well in this DNA solution including 8 permitting/inserting Takara ligation kit A liquid. Furthermore it added 10 permitting/inserting Takara ligation kit B liquid to this DNA solution, 16 °C, 30-minute incubate did.

[0018] After 0 °C, 1 hour standing, it did thermal processing of 42 °C, 2 min in competent cell (TOYOBO make) of E. coli JM109 strain including aforementioned DNA solution, 37 °C and the 1 hour shaking it did including SOC culture medium (triptone 2%, yeast extract 0.5%, 0.025M NaCl, 0.0025 KCl, 0.01M Mg SO<sub>4</sub>, 0.01M Mg Cl<sub>2</sub>, 0.02M glucose: pH 7.4). it applied E. coli which is acquired, to 50 g/ml ampicillin, the 1 mM IPTG (isopropyl -  $\beta$ -galactopyranoside), and LB culture medium (10% triptone, 5% yeast extract and 10% NaCl: pH 8.0) which includes 0.02% X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside), 37 °C and 1 night stationary culture did. plasmid was manufactured from white colony which appears, colony which keeps plasmid of objective by analyzing restriction enzyme cleavage map screening was done. colony which screening is done was cultured with LB liquid culture medium (50 g/ml ampicillin content) of 300 ml, plasmid DNA large scale preparation was done with SDS-alkali method.

#### [0019] (2) Manufacturing XbaI-KpnI fragment

37 °C, 2 time reacting to plasmid (1 g) which is manufactured with the aforementioned (1) including restriction enzyme XbaI and KpnI (Each 5units), it cut off the plasmid DNA. liquid which includes this DNA fragment, was applied on 1.0% agarose gel electrophoresis (100V and 2 hours), the band of

。切り出したゲルから、分子量約9.9 kbpのDNA断片を電氣的に溶出し、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿して精製した後、TE緩衝液に溶解した。

【0020】 (3) チオストレプトン耐性遺伝子を含むDNA断片の取得

プラスミドpIJ702を保持する菌株である*Streptomyces lividans* TK-24を500mlの液体培地 [Nutrient Broth No.2 (Oxoid) 2.5%, グルコース 1%, グリシン 1%] に接種し、30°Cで21時間振盪培養した。この時点で培養液中0.5 units/mlの濃度となるようにペニシリンGを添加し、さらに30°Cで3時間培養を継続した。培養液から*Streptomyces lividans* TK-24の菌体を集菌し、TE緩衝液 (0.025M トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (トリス)、0.025M EDTA : pH8.0) で洗浄後、菌体を溶菌液 (0.3M ショ糖、0.025M トリス、0.025M EDTA、2mg/ml リゾチーム、2mg/ml アクロモペプチダーゼ、50 µg/ml RNase : pH8.0) 20mlに懸濁し、30°Cで2時間反応させた。その反応液に、2%ラウリル硫酸ナトリウムと0.3M水酸化ナトリウムからなる溶液10mlを添加し、良く混合してから55°Cの湯浴中に1時間置いた。この液中に、フェノール・クロロホルム (1容 : 1容) 溶液4mlを加え、全体が白濁するまで良く混ぜた (1分間)。得られた白濁液を、4°Cで30分間17000 ×gの遠心にかけて、上層を採取した。

【0021】 再度、上層1容に対し、1容のフェノール・クロロホルム (1容 : 1容) 溶液を加え良く混ぜた後、4°Cで30分間17000 ×gの遠心分離を行い、分離した上層を採取した。採取した上層1容に対し、1容のジエチルエーテルを加え、穏やかに攪拌した後しばらく放置した。上層に分離するジエチルエーテル層を捨て、再度下層にジエチルエーテルを加え抽出した。エーテル抽出後分離する下層1容に対し、0.1容の3M酢酸ナトリウム水溶液と2容のエタノールを加え、析出する沈殿物を遠心で回収した。

【0022】 回収した沈殿物を5mlのTE緩衝液に溶解し、その

approximately 9.9 kbp was cut. In this case, molecular weight of DNA fragment was calculated making use of theHindIII digest of lambda phage DNA as size marker. from gel which is cut, it liquated DNA fragment of the molecular weight approximately 9.9 kbp in electrical, phenol - chloroform treatment andthe ethanol precipitation did and after refining, it melted in TE buffer.

[0020] (3) Includes thio S pick-up P ton resistance gene acquisition of DNA fragment which

Inoculation it did *Streptomyces lividans* TK-24 which is a strain which keeps plasmid pI J702 in liquid culture medium (Nutrient Broth No.2 (Oxoid) 2.5%, glucose 1%, glycine 1%), of 500 ml 21 hour shaking culture did with 30 °C. In order to become concentration of culture medium 0.5 units/ ml with this time point, penicillin G was added, furthermore 3 hours culture continued with 30 °C. microbe collection it did cell mass of *Streptomyces lividans* TK-24 from fermentation broth, with TE buffer (0.025M tris (hydroxymethyl) aminomethane (tris) and 0.025 MED TA : pH 8.0) after washing, suspension did cell mass in the lysate (0.3M sucrose, 0.025M tris, 0.025 MED TA, 2 mg/ml lysozyme, 2 mg/ml achromopeptidase (EC 3.4.21.50) and 50 g/ml RNase : pH 8.0) 20 ml, 2 time reacted with 30 °C. In reaction mixture, to add solution 10 ml which consists of 2% sodium lauryl sulfate and the 0.3M sodium hydroxide, after mixing well, 1 hour you put in warm bath of 55 °C. Until in this liquid, entirely clouding does including phenol \* chloroform (1 permitting/inserting: 1 permitting/inserting) solution 4 ml, it mixed well, (1 minute). you applied clouding liquid which is acquired, on centrifugation of the 30 min 17000 Xg with 4 °C, top layer recovered.

[0021] For second time, after mixing well vis-a-vis top layer 1 permitting/inserting, including 1 permitting/inserting phenol \* chloroform (1 permitting/inserting: 1 permitting/inserting) solution, it did centrifugal separation of 30-minute 17000 Xg with 4 °C, top layer which is separated it recovered. After agitating calmly, vis-a-vis top layer 1 permitting/inserting which recovers, including 1 permitting/inserting diethyl ether, it left for a while. You threw away diethyl ether layer which is separated into top layer, for the second time you extracted in bottom layer including diethyl ether. precipitate which is precipitated vis-a-vis bottom layer 1 permitting/inserting which after ether extraction is separated, including the 0.1 permitting/inserting 3M sodium acetate aqueous solution and 2 permitting/inserting ethanol, it recovered with centrifugation.

[0022] It melted precipitate which recovers in TE buffer

液にCsClを7.5g、1.5mg/ml臭化エチジウム-TE緩衝液を2ml加え混合した。この溶液を42時間 120,000 × gの密度勾配遠心分離にかけた。紫外線照射により検出されたプラスミド画分を分取した。このプラスミド画分をn-ブタノールで処理し臭化エチジウムを除いた。更に、TE緩衝液に対して透析後、エタノール沈殿により精製プラスミド画分を得た。次いで、この精製プラスミド画分10 μgを制限酵素BclI(2単位)で37℃、4時間完全消化し、これを1.0%アガロースゲル電気泳動(100V、2時間)にかけ、約1.05kbpのバンドを切り出した。切り出したゲルから、分子量約1.05kbpのDNA断片を電気的に溶出し、フェノール-クロロホルム処理、エタノール沈殿して精製した後、TE緩衝液に溶解した。

【0023】(4) チオストレプトン耐性遺伝子のサブクローニング

大腸菌由来のベクタpUC18 0.5 μgを制限酵素BamHI(5units)と37℃、2時間反応させプラスミドDNAを切断した。反応液1容に対し、1M Tris-HCl(pH8.0)を1/10容加えアルカリホスファターゼ(1unit)と65℃、1時間反応させた。この溶液をフェノール-クロロホルム処理し、エタノール沈殿してDNA断片を回収し、TE緩衝液に溶解した。前記の(3)で調製したチオストレプトン耐性遺伝子を含むDNA断片を含む液とpUC18 DNA断片を含む液を、各1容ずつ混合し、Takara ligation kit A液を8容加え、良く攪拌した。更に、10容のTakara ligation kit B液を追加して、16℃、30分間インキュベートした。

【0024】大腸菌JM109株のコンピテントセル(TOYOBO製)に上記反応液を加え、0℃、1時間静置後、42℃、2分間の熱処理を行い、SOC培地〔トリプトン 2%、酵母エキス 0.5%、0.025M NaCl、0.0025 KCl、0.01M MgSO<sub>4</sub>、0.01M MgCl<sub>2</sub>、0.02M グルコース：pH7.4〕を加えて37℃、1時間振とうした。得られた大腸菌を、50 μg/mlアンピシリン、1mM IPTG(イソプロピル-β-ガラクトピラノシド)、および0.02% X-gal(5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド)を含むLB培地〔トリプトン 10%、酵母エキス 5%、NaCl 10%：pH 8.0〕に塗布し、37℃、1夜静置培養した。出現した白色コロニーよりプラスミドを調製し、制限酵素BclIでゲルを解析することにより目的のプラスミドを保持しているコロニーをスクリーニングした。スクリーニングしたコロニーを300mlのLB液体培地(アンピシリン 50 μg/ml含有)で培養し、プラスミドDNAをSDS-アルカリ法により大量調製した。

of 5 ml, to the liquid 2 ml added 7.5g and 1.5 mg/ml ethidium bromide-TE buffer and mixed CsCl. This solution was applied on density gradient centrifugal separation of 42 hours 120,000 X g. plasmid fraction which is detected by ultraviolet light illumination fraction collection was done. This plasmid fraction was treated with n-butanol and ethidium bromide was excluded. Furthermore, refining plasmid fraction was acquired after dialysis, with the ethanol precipitation vis-a-vis TE buffer. Next, this refining plasmid fraction 10 g 37 °C and 4 hours complete digestion was done with restriction enzyme BclI(2 unit), this was applied on 1.0% agarose gel electrophoresis (100V and 2 hours), band of approximately 1.05 kbp was cut. from gel which is cut, it liquated DNA fragment of the molecular weight approximately 1.05 kbp in electrical, phenol - chloroform treatment and the ethanol precipitation did and after refining, it melted in TE buffer.

[0023] (4) Subcloning of thio S pick-up P ton resistance gene

E. coli derivative expressing クタ pUC18 0.5 g restriction enzyme BamHI(5units) and 37 °C and the 2 hours reacting, it cut off plasmid DNA. Vis-a-vis reaction mixture 1 permitting/inserting, 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 1/10 permitting/inserting adding alkaline phosphatase (1unit) and 65 °C and 1 hour it reacted. phenol - chloroform it treated this solution, ethanol precipitation did and DNA fragment recovered, in TE buffer melted. At a time each 1 permitting/inserting it mixed liquid which includes DNA fragment which includes thio S pick-up P ton resistance gene which is manufactured with aforementioned (3) and liquid which includes the pUC18 DNA fragment, 8 permitting/inserting added Takara ligation kit A liquid, agitated well. Furthermore, adding 10 permitting/inserting Takara ligation kit B liquid, 16 °C, 30 min incubate it did.

[0024] After 0 °C, 1 hour standing, it did thermal processing of 42 °C, 2 min in competent cell (TOYOBO make) of E. coli JM109 strain including above-mentioned reaction mixture, 37 °C and the 1 hour shaking it did including SOC culture medium (triptone 2%, yeast extract 0.5%, 0.025M NaCl, 0.0025 KCl, 0.01M Mg SO<sub>4</sub>, 0.01M MgCl<sub>2</sub>; 0.02M glucose : pH 7.4). it applied E. coli which is acquired, to 50 g/ml ampicillin, the 1 mM IPTG (isopropyl - galactopyranoside), and LB culture medium (triptone 10%, yeast extract 5% and NaCl 10% : pH 8.0) which, includes the 0.02% X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl - D-galactopyranoside) 37 °C and 1 night stationary culture did. plasmid was manufactured from white colony which appears, colony which keeps plasmid of objective by analyzing restriction cleavage enzyme

【0025】(5) XbaI-KpnI(チオストレプトン耐性遺伝子を含む)断片の調製

前記(4)で調製したプラスミド(1  $\mu$ g)に制限酵素XbaIとKpnI(各5units)を加え、37°C、2時間反応させプラスミドDNAを切断した。得られる液を、1.0%アガロースゲル電気泳動(100V、2時間)にかけ、約1.05kbpのバンドを切り出した。この際、サイズマーカーとしてラムダファージDNAのHindIII消化物を用い、DNA断片の分子量を算出した。切り出したゲルから、分子量約1.05kbpのDNA断片を電気的に溶出し、フェノールクロロホルム処理、エタノール沈殿して精製した後、TE緩衝液に溶解した。

【0026】(6) プラスミドpNC5403の作製

前記(2)で調製したプラスミド断片を含む溶液と、前記(5)で調製したチオストレプトン耐性遺伝子を含む分子量約1.05kbpのDNA断片を含む溶液、各1容ずつ混合し、Takara ligation kit A液を8容加え、良く攪拌した。さらに、このDNA溶液に10容のTakara ligation kit B液を追加し、16°C、30分間インキュベートした。

【0027】大腸菌 JM109株のコンピテントセル (TOYOBO製)に上記反応液を加え、0°C、1時間静置後、42°C、2分間の熱処理を行い、SOC培地を加えて37°C、1時間振とうした。得られた大腸菌を、50  $\mu$ g/ml アンピシリン、1mM IPTG、および0.02% X-galを含むLB培地に塗布し、37°C、1夜静置培養した。出現した白色コロニーよりプラスミドを調製し、制限酵素開裂地図を解析することにより目的のプラスミドを保持しているコロニーをスクリーニングした。このプラスミドをpNC5403と命名した。スクリーニングにより得たコロニーを300mlのLB液体培地(アンピシリン 50  $\mu$ g/mlを含有)で培養し、プラスミドpNC5403をSDS-アルカリ法により大量調製した。

【0028】(7) Rhodococcus 属細菌の形質転換

Rhodococcus rhodochrous ATCC 12674 株1白金耳を液体培地 [Nutrient Broth No. 2(Oxoid) 2.5%, グルコース 1%, グリシン 1

mapthe screening was done. colony which screening is done was cultured with LB liquid culture medium (ampicillin 50 g/ml content) of 300 ml, plasmid DNA large scale preparation was done with SDS-alkali method.

[0025] (5) Manufacturing XbaI-KpnI (thio streptomycin resistance gene is included.) fragment

37°C and 2 hours reacting to plasmid (1 g) which is manufactured with aforementioned (4) including restriction enzyme XbaI and KpnI (each 5units), it cut off plasmid DNA. liquid which is acquired, was applied on 1.0% agarose gel electrophoresis (100V and 2 hours), the band of approximately 1.05 kbp was cut. In this case, molecular weight of DNA fragment was calculated making use of the HindIII digest of lambda phage DNA as size marker. from gel which is cut, it liquated DNA fragment of the molecular weight approximately 1.05 kbp in electrical, phenol-chloroform treatment and the ethanol precipitation did and after refining, it melted in TE buffer.

[0026] (6) Production of plasmid pNC5403

Solution and each 1 permitting/inserting which include DNA fragment of molecular weight approximately 1.05 kbp which includes thio streptomycin resistance gene which is manufactured with solution and aforementioned (5) which include plasmid fragment which is manufactured with aforementioned (2) it mixed, 8 permitting/inserting added Takara ligation kit A liquid, agitated well. Furthermore, it added 10 permitting/inserting Takara ligation kit B liquid to this DNA solution, 16°C, 30 min incubate did.

[0027] After 0°C, 1 hour standing, it did thermal processing of 42°C, 2 min in competent cell (TOYOBO make) of E. coli JM109 strain including above-mentioned reaction mixture, 37°C and the 1 hour shaking it did including SOC culture medium. it applied E. coli which is acquired, to LB culture medium which includes 50 g/ml ampicillin, 1 mM IPTG, and 0.02% X-gal, 37°C and 1 night stationary culture did. plasmid was manufactured from white colony which appears, colony which keeps plasmid of objective by analyzing restriction enzyme cleavage map screening was done. This plasmid pNC5403 it designated. colony which is acquired with screening was cultured with LB liquid culture medium (ampicillin 50 g/ml content) of 300 ml, plasmid pNC5403 large scale preparation was done with SDS-alkali method.

[0028] (7) Neoplastic transformation of Rhodococcus being attached bacteria

Inoculation it did Rhodococcus rhodochrous ATCC 12674 strain 1 platinum loop in liquid culture

% ] に接種し、30℃で21時間振盪培養した。この時点で培養液中0.5units/ml の濃度となるようにペニシリンG を添加し、さらに30℃で3 時間培養を継続した。培養液から菌体を集菌し、P 緩衝液 [ ショ糖 10.3g,  $K_2SO_4$  0.025g,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  0.202g, 微量金属液 0.2ml, 0.5%  $KH_2PO_4$  1ml, 3.68%  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  10ml, 5.73% トリスメチル-2- アミノエタンスルホン酸 10ml,  $H_2O$  80ml : pH7.2 ] で洗浄後、溶菌液 [ 10mg リゾチーム、10mg アクロモベプチダーゼ/ml P緩衝液 ] に懸濁した。この懸濁液を30℃で2 時間インキュベートした後、遠心分離で集菌し、P 緩衝液で2 回洗浄し、再びP 緩衝液に懸濁した。上記のプラスミドpNC5401 溶液 1  $\mu$ l (該プラスミドを0.1  $\mu$ g含有) と菌体懸濁液10  $\mu$ l (109cell/ml) を混合し、更に200  $\mu$ l の25%PEG8000 (ポリエチレングリコール8000/P緩衝液) を添加混合し、25℃で10分間インキュベートした。この液を100  $\mu$ l づつ、R2YE再生寒天培地 [ ショ糖 10.3g,  $K_2SO_4$  0.025g,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  1.012g, グルコース 1g, カザミノ酸 0.01g, 微量金属液0.2ml, 酵母エキス 0.5g, トリスメチル-2- アミノエタンスルホン酸 0.573g, 寒天 2.2g, 0.5%  $KH_2PO_4$  1.0ml, 5M  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.4ml, 20% L-アルギニン 1.5ml, 1N NaOH 0.7ml,  $H_2O$  100ml ] に塗布し30℃で24時間培養した後、50  $\mu$ l/ml チオストレプトン入り SNA寒天培地 [ Nutrient broth 0.8%, 寒天 0.3% ] を重層し、更に、30℃で3 ~ 5日間培養した。出現したコロニーよりプラスミドを回収、精製しアガロースゲル電気泳動に供し、ゲルを臭化エチジウムで染色することにより、分子量 約11.0 kbpのプラスミドpNC5403 の存在を確認した。上記培養された菌株は、*Rhodococcus rhodochrous* 12674 (PNC 5403) (受託番号FERM P-14322) として工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

medium (Nutrient Broth No.2 (Oxoid) 2.5%, glucose 1%, glycine 1%), 21 hour shaking culture did with the 30 °C. In order to become concentration of culture medium 0.5 units/ml with this time point, penicillin G was added, furthermore 3 hours culture continued with 30 °C. microbe collection it did cell mass from fermentation broth, after washing in lysate (10 mg lysozyme and 10 mg achromopeptidase (EC 3.4.21.50) / ml P buffer ) suspension did with P buffer ( sucrose 10.3g,  $K_2SO_4$  0.025g,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  0.202g, trace metal liquid 0.2 ml, 0.5%  $KH_2PO_4$  1 ml, 3.68%  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  10 ml, 5.73% tris methyl-2-amino ethane sulfonic acid 10 ml,  $H_2O$  80 ml : pH 7.2 ). With 30 °C 2 hours incubate after doing, microbe collection it did this suspension with the centrifugal separation, 2 time washed with P buffer, suspension did again in P buffer. It mixed above-mentioned plasmid pNC5401 solution 1 l ( said plasmid 0.1 g content ) and cell mass suspension 10 l (109 cells/ml) , furthermore the adding and mixing did 25% PEG 8000 (polyethylene glycol 8000/P buffer) of 200 l, 10 min ink ゆべ I jp7 did with 25 °C. At a time 100 l , it applied this liquid to R2YE regeneration agar culture medium ( sucrose 10.3g,  $K_2SO_4$  0.025g,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  1.012g, glucose 1g, casamino acid 0.01g, trace metal liquid 0.2 ml, yeast extract 0.5g, tris methyl-2-amino ethane sulfonic acid 0.573g, agar 2.2g, 0.5%  $KH_2PO_4$  1.0 ml, 5 M  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.4 ml, 20% L-arginine 1.5 ml, 1N NaOH 0.7 ml,  $H_2O$  100 ml ) and the 24 hours after culturing with 30 °C, double layer it did 50 l/ml thio スピックアップ トン entering SNA agar culture medium (Nutrient broth 0.8%, agar 0.3%) furthermore, 3 to 5 day cultured with 30 °C. From colony which appears it recovered, refined plasmid and offered to agarose gel electrophoresis, it verified existence of plasmid pNC5403 of the molecular weight approximately 11.0 kbp by dyeing gel with ethidium bromide. Well description above as for strain which was cultured, as the *Rhodococcus rhodochrous* 12674 (PNC 5403) (deposit number FERM P-14322) in Agency of Industrial Science and Technology National Institute of Bioscience and Human-Technology deposit it is.

【0029】

## 【実施例2】

ベクタープラスミド pNC9501 の構築

(1) プラスミドpNC903の大腸菌由来のベクターpUSG299 へのクローニング

プラスミドpNC903 (1  $\mu$ g) に制限酵素ClaI (5units) を加え、37 °C、2 時間反応させた。これを、1.0%アガロースゲル電気泳動 (100V、2時間) にかけて、約2.4kbpのバンドを切り出した。この際、サイズマーカーとしてラムダファージDNAのHindIII

[0029]

## [Working Example 2]

Construction of vector plasmid pNC9501

(1) Cloning to vector p USG 299 of E. coli derivation of plasmid pNC903

37 °C, 2 time it reacted to plasmid pNC903 (1 g) including restriction enzyme ClaI (5units). This, was applied on 1.0% agarose gel electrophoresis (100V and 2 hours), band of approximately 2.4 kbp was cut.



II 消化物を用い、DNAのサイズを算出した。切り出したゲルから約2.4 kbpのDNA断片を電気的に溶出し、フェノール-クロロホルム処理、エタノール沈殿して、精製した。精製したDNA断片を、TE緩衝液 [0.025M トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (トリス)、0.025M EDTA : pH8.0] に溶解した。

【0030】一方、大腸菌由来のベクターpHSG299 0.5  $\mu$ g を制限酵素 AccI (5units)で、37°C、2時間反応させプラスミドDNAを切断した。この反応液1容に1/10容の1M Tris-HCl (pH8.0)を加え、アルカリホスファターゼ(1unit)と65°C、1時間反応させた。この溶液をフェノール-クロロホルム処理し、エタノール沈殿して、DNA断片を回収しTE緩衝液に溶解した。

【0031】上記のpNC903 DNA断片とpHSG299 DNA断片を含む液を、各1容ずつ混合し、Takara ligation kit A液をこのDNA溶液8容を加え、良く攪拌した。更に、このDNA溶液に10容のTakara ligation kit B液を追加し、16°C、30分間インキュベートした。

【0032】大腸菌 JM109株のコンピテントセル (TOYOBO製) に上記反応液を加え、0°C、1時間静置後、42°C、2時間の熱処理を行い、SOC培地 [トリプトン 2%、酵母エキス 0.5%、0.025M NaCl、0.0025 KCl、0.01M MgSO<sub>4</sub>、0.01M MgCl<sub>2</sub>、0.02M グルコース : pH7.4] を加えて37°C、1時間振とうした。得られた大腸菌を、50  $\mu$ g/mlカナマイシン、1mM IPTG (イソプロピル- $\beta$ -ガラクトピラノシド)、および0.02% X-gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド)を含むLB培地 [トリプトン 10%、酵母エキス 5%、NaCl 10% : pH8.0] に塗布し、37°C、1夜静置培養した。出現した白色コロニーよりプラスミドを調製し、制限酵素地図を解析することにより目的のプラスミドを保持しているコロニーをスクリーニングした。スクリーニングしたコロニーを300mlのLB液体培地 (カナマイシン 50  $\mu$ g/ml含有) で培養し、プラスミドDNAをSDS-アルカリ法により大量調製した。

#### 【0033】(2) XbaI-KpnI 断片の調製

前記(1)で調製したプラスミド(1  $\mu$ g)に制限酵素XbaIと制限酵素KpnI (各5units)を加え、37°C、2時間反応させプラスミドDNAを切断した。このDNA断片を含む液を、1.0%アガロースゲル電気泳動 (100V、2時間) にかけて、約5.1 kbpのバンドを切り出した。この際、サイズマーカーとしてラムダファージDNAのHindIII消化物を用い、DNA断片の分子量を算

In this case, size of DNA was calculated making use of the HindIII digest of lambda phage DNA as size marker. from gel which is cut it liquated DNA fragment of approximately 2.4 kbp in electrical, phenol - chloroform treatment and the ethanol precipitation did, refined. It refined and melted DNA fragment, in TE buffer (0.025M tris (hydroxymethyl) aminomethane (tris) and 0.025 MED TA : pH 8.0).

[0030] On one hand, vector pHSG299 0.5 g of E. coli derivation with restriction enzyme AccI (5units), 37°C and 2 hours reacting, it cut off plasmid DNA. alkaline phosphatase (1unit) and 65°C and 1 hour it reacted to this reaction mixture 1 permitting/inserting including 1/10 permitting/inserting 1 M Tris-HCl (pH 8.0). phenol - chloroform it treated this solution, ethanol precipitation did, DNA fragment recovered and and in TE buffer melted.

[0031] Above-mentioned pNC903 DNA fragment and 1 liquid which includes pHSG299 DNA fragment were mixed, at a time each 1 permitting/inserting, Takara ligation kit A liquid was agitated well including this DNA solution 8 permitting/inserting. Furthermore, it added 10 permitting/inserting Takara ligation kit B liquid to this DNA solution, 16°C, 30-minute incubate did.

[0032] After 0°C, 1 hour standing, it did thermal processing of 42°C, 2 min in competent cell (TOYOBO make) of E. coli JM109 strain including above-mentioned reaction mixture, 37°C and the 1 hour shaking it did including SOC culture medium (triptone 2%, yeast extract 0.5%, 0.025M NaCl, 0.0025 KCl, 0.01M MgSO<sub>4</sub>, 0.01M MgCl<sub>2</sub>, 0.02M glucose : pH 7.4). it applied E. coli which is acquired, to LB culture medium (triptone 10%, yeast extract 5% and NaCl 10% : pH 8.0) which, includes 50 g/ml kanamycin, 1 mM IPTG (isopropyl -  $\beta$  - galactopyranoside), and 0.02% X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl -  $\beta$ -D-galactopyranoside) the 37°C and 1 night stationary culture did. plasmid was manufactured from white colony which appears, colony which keeps plasmid of objective by analyzing restriction enzyme map screening was done. colony which screening is done was cultured with LB liquid culture medium (kanamycin 50 g/ml content) of 300 ml, plasmid DNA large scale preparation was done with SDS-alkali method.

#### [0033] (2) Manufacturing XbaI-KpnI fragment

37°C, 2 time reacting to plasmid (1 g) which is manufactured with the aforementioned (1) including restriction enzyme XbaI and restriction enzyme KpnI (Each 5units), it cut off plasmid DNA. liquid which includes this DNA fragment, was applied on 1.0% agarose gel electrophoresis (100V and 2 hours),



出した。切り出したゲルから、分子量約5.1 kbpのDNA断片を電氣的に溶出し、フェノール-クロロホルム処理、エタノール沈殿して精製した後、TE緩衝液に溶解した。

#### 【0034】 (3) プラスミドpNC9501 の作製

前記(2)で調製したプラスミド断片を含む溶液と、上記の実施例1の(5)で調製したテオストレプトン耐性遺伝子を含むDNA断片(約1.05 kbpのXbaI-KpnI制限酵素切断DNA断片)を含む溶液、各1容ずつ混合し、Takara ligation kit A液8容を加え、良く攪拌した。さらに、このDNA溶液に10容のTakara ligation kit B液を追加し、16°C、30分間インキュベートした。

【0035】大腸菌JM109株のコンピテントセル(TOYOBO製)に上記反応液を加え、0°C、1時間静置後、42°C、2分間の熱処理を行い、SOC培地を加えて37°C、1時間振とうした。得られた大腸菌を、50 µg/mlカナマイシン、1mM IPTG、および0.02% X-galを含むLB培地に塗布し、37°C、1夜静置培養した。出現した白色コロニーよりプラスミドを調製し、制限酵素開裂地図を解析することにより目的のプラスミドを保持しているコロニーをスクリーニングした。このプラスミドをpNC9501と命名した。スクリーニングにより得たコロニーを300mlのLB液体培地(カナマイシン 50 µg/ml含有)で培養し、プラスミドpNC9501をSDS-アルカリ法により大量調製した。

#### 【0036】 (4) Rhodococcus 属細菌の形質転換

Rhodococcus rhodochrous ATCC 12674株1白金耳を液体培地(Nutrient Broth No. 2(Oxoid) 2.5%, グルコース 1%, グリシン 1%)に接種し、30°Cで21時間振盪培養した。この時点で培養液中0.5 units/mlの濃度となるようにペニシリンGを添加し、さらに30°Cで3時間培養を継続した。培養液から菌体を集菌し、P緩衝液[ショ糖 10.3g, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.025g, MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 0.202g, 微量金属液 0.2ml, 0.5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1ml, 3.68% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 10ml, 5.73% トリスメチル-2-アミノエタンスルホン酸 10ml, H<sub>2</sub>O 80ml : pH7.2]で洗浄後、溶菌液[10mg リゾチーム、10mg アクロモペプチダーゼ/ml P緩衝液]に懸濁した。この懸濁液を30°Cで2時間インキュベートした後、遠心分離で集菌し、P緩衝液で2回洗浄し、再びP緩衝液に懸濁した。上記のプラスミドpNC9501溶液1 µl(該プラスミドを0.1 µg含有)と菌体懸濁液10 µl(10<sup>8</sup> cell/ml)を混合し、更に200 µlの25%PEG8000(ポリエチレングリコール8000/P緩衝液)を添加混

the band of approximately 5.1 kbp was cut. In this case, molecular weight of DNA fragment was calculated making use of the HindIII digest of lambda phage DNA as size marker. from gel which is cut, it liquefied DNA fragment of the molecular weight approximately 5.1 kbp in electrical, phenol-chloroform treatment and the ethanol precipitation did and after refining, it melted in TE buffer.

#### [0034] (3) Production of plasmid pNC9501

Solution and each 1 permitting/inserting which include DNA fragment (XbaI-KpnI restriction enzyme cutting DNA fragment of approximately 1.05 kbp) which includes this pick-up ton resistance gene which is manufactured with (5) of solution and above-mentioned Working Example 1 which include plasmid fragment which is manufactured with aforementioned (2) it mixed, it agitated well including Takara ligation kit A liquid 8 permitting/inserting. Furthermore, it added 10 permitting/inserting Takara ligation kit B liquid to this DNA solution, 16 °C, 30 min incubate did.

[0035] After 0 °C, 1 hour standing, it did thermal processing of 42 °C, 2 min in competent cell (TOYOBO make) of E. coli JM109 strain including above-mentioned reaction mixture, 37 °C and the 1 hour shaking it did including SOC culture medium it applied E. coli which is acquired, to LB culture medium which includes 50 g/ml kanamycin, 1 mM IPTG, and 0.02% X-gal, 37 °C and 1 night stationary culture did. plasmid was manufactured from white colony which appears, colony which keeps plasmid of objective by analyzing restriction enzyme cleavage map screening was done. This plasmid pNC9501 it designated. colony which is acquired with screening was cultured with LB liquid culture medium (kanamycin 50 g/ml content) of 300 ml, plasmid pNC9501 large scale preparation was done with SDS-alkali method.

#### [0036] (4) Neoplastic transformation of Rhodococcus being attached bacteria

Inoculation it did Rhodococcus rhodochrous ATCC 12674 strain 1 platinum loop in liquid culture medium (Nutrient Broth No. 2(Oxoid) 2.5%, glucose 1%, glycine 1%), 21 hour shaking culture did with the 30 °C. In order to become concentration of culture medium 0.5 units/ml with this time point, penicillin G was added, furthermore 3 hours culture continued with 30 °C. microbe collection it did cell mass from fermentation broth, after washing in lysate (10 mg lysozyme and 10 mg achromopeptidase (EC 3.4.21.50)/ml P buffer) suspension did with P buffer (sucrose 10.3g, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.025g, MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 0.202g, trace metal liquid 0.2 ml, 0.5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 ml, 3.68% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 10 ml, 5.73% tris methyl-2-amino ethane sulfonic acid 10 ml, H<sub>2</sub>O 80 ml : pH

合し、25℃で10分間インキュベイトした。この液を100  $\mu$ l づつ、R2YE再生寒天培地〔ショ糖 10.3g,  $K_2SO_4$  0.025g,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  1.012g, グルコース 1g, カザミノ酸 0.01g, 微量金属液0.2ml, 酵母エキス 0.5g, トリスメチル-2-アミノエタンスルホン酸 0.573g, 寒天 2.2g, 0.5%  $KH_2PO_4$  1.0ml, 5M  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.4ml, 20% L-アルギニン 1.5ml, 1N NaOH 0.7ml,  $H_2O$  100ml〕に塗布し30℃で24時間培養した後、50  $\mu$ l/mlチオストレプトン入り SNA寒天培地〔Nutrient broth 0.8%, 寒天 0.3%〕を重層し、更に30℃で3～5日間培養した。出現したコロニーよりプラスミドを回収、精製し、アガロースゲル電気泳動に供し、ゲルを臭化エチジウムで染色することにより、分子量 約6.2 kbp のプラスミドpNC9501 の存在を確認した。上記培養された菌株は、*Rhodococcus rhodochrous* 12674 (PNC 9501) (受託番号FERM P-14323) として工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

## 【0037】

【発明の効果】本発明の新規プラスミドは、大腸菌及び*Rhodococcus* 属細菌内で複製可能なシャトルベクタープラスミドで、その工業的に利用しうる微生物を育種、改良するために有用である。特に、本発明で用いられる環状プラスミドpNC903は、種々の制限酵素による開裂部位各一つを有しており、この特定される開裂部位を利用して、外来のDNA断片を導入修飾し、多くの有用なプラスミドベクターを開発することができる。更に、当該プラスミドは、ノカルディオフォルム細菌を宿主として、ノカルディオフォルム細菌中において複写が可能である。宿主ベクター系におけるプラスミドベクターとして有用である。また、該プラスミドを用いて、外来のDNA断片を導入修飾して得られる環状プラスミドベクターとし、更に得られる環状プラスミドベクターに種々の酵素或は蛋白質をコードする遺伝子を組み込み得られる環状プラスミドを導入した宿主微生物の形質転換株を利用し、該形質転換株を培養して目的の酵素或は蛋白質を産出させることができ、又目的とする酵素とその基質との反応による有用な代謝物や酵素反応産物の製造を行うことができる。

7.2). With 30 °C 2 hours ink  $\phi$ ベIjp7 after doing, microbe collection it did this suspension with centrifugal separation, 2 time washed with P buffer, the suspension did again in P buffer. It mixed above-mentioned plasmid pNC9501 solution 1 l (said plasmid 0.1 g content) and cell mass suspension 10 l (10<sup>9</sup> cells/ml), furthermore the adding and mixing did 25% PEG 8000 (polyethylene glycol 8000/P buffer) of 200 l, 10 min ink  $\phi$ ベIjp7 did with 25 °C. At a time 100 l, it applied this liquid to R2YE regeneration agar culture medium (sucrose 10.3g,  $K_2SO_4$  0.025g,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  1.012g, glucose 1g, casamino acid 0.01g, trace metal liquid 0.2 ml, yeast extract 0.5g, tris methyl-2-amino ethane sulfonic acid 0.573g, agar 2.2g, 0.5%  $KH_2PO_4$  1.0 ml, 5 M  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.4 ml, 20% L-arginine 1.5 ml, 1N NaOH 0.7 ml,  $H_2O$  100 ml) and the 24 hours after culturing with 30 °C, double layer it did 50 l/ml thio スpick-up プton entering SNA agar culture medium (Nutrient broth 0.8%, agar 0.3%) furthermore 3 to 5 day cultured with 30 °C. From colony which appears it recovered, refined plasmid, offered to agarose gel electrophoresis, it verified existence of plasmid pNC9501 of molecular weight approximately 6.2 kbp by dyeing gel with ethidium bromide. Description above strain which was cultured deposit is done in the Agency of Industrial Science and Technology National Institute of Bioscience and Human-Technology as *Rhodococcus rhodochrous* 12674 (PNC 9501) (deposit number FERM P-14323).

## 【0037】

[Effects of the Invention] Novel plasmid of this invention inside *E. coli* and *Rhodococcus* being attached bacteria with replicatable shuttle vector plasmid, is useful in order breeding, to improve the microorganism which it can utilize in industrially. Especially, cyclic plasmid pNC903 which is used with this invention has had cleavage site each one due to various restriction enzyme, making use of cleavage site which this specific is done, can introduce can decorate imported DNA fragment, can develop many useful plasmid vector. Furthermore, as for this said plasmid, copy is possible with no cult. D. off  $\phi$ jp11  $\Delta$  bacteria as host, in in no cult. D. off  $\phi$ jp11  $\Delta$  bacteria, it is useful as plasmid vector in host-vector system. In addition, said plasmid using, introducing decorating imported DNA fragment, cyclic plasmid vector which is acquired to do, Furthermore it is possible to produce useful metabolite and enzymatic reaction product with the various enzyme or to install gene which protein code is done making use of neoplastic transformation strain of host microorganism which introduces cyclic plasmid which is acquired, culturing said neoplastic transformation strain, enzyme of objective or it

is possible, to produce protein, with reaction of enzyme and the substrate which in addition it makes objective in cyclic plasmid vector which is acquired.

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明のシャトルベクターpNC 5403の制限酵素開裂地図。

【図 2】 本発明のシャトルベクターpNC 9501の制限酵素開裂地図。

【図 3】 プラスミドpNC500の制限酵素開裂地図。

【図 4】 プラスミドpNC903の制限酵素開裂地図。

【図 5】 プラスミドpHSG298 及びpHSG299 の制限酵素開裂地図。

【図 6】 プラスミドpUC18 及びpUC19 の制限酵素開裂地図。

[Brief Explanation of the Drawing(s)]

[Figure 1] Restriction enzyme rupture map of shuttle vector pNC 5403 of this invention.

[Figure 2] Restriction enzyme rupture map of shuttle vector pNC 9501 of this invention.

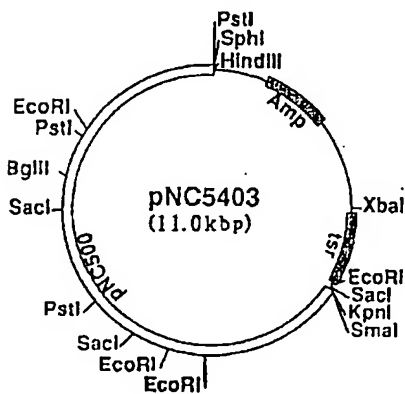
[Figure 3] Restriction enzyme cleavage map of plasmid pNC500.

[Figure 4] Restriction enzyme cleavage map of plasmid pNC903.

[Figure 5] Restriction enzyme cleavage map of plasmid pHSG298 and pHSG299.

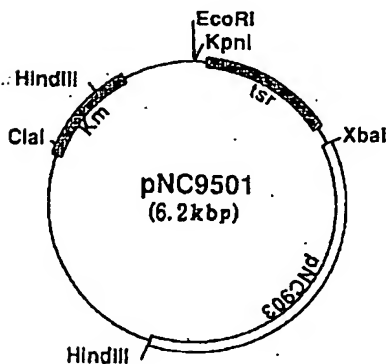
[Figure 6] Restriction enzyme cleavage map of plasmid pUC18 and pUC19.

【図 1】



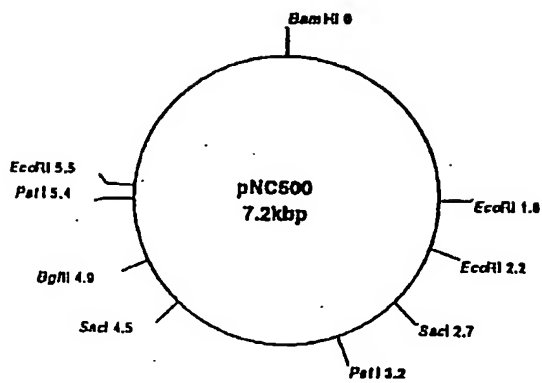
[Figure 1]

【図 2】



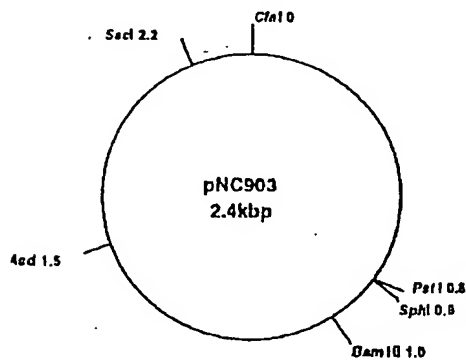
[Figure 2]

【圖 3】



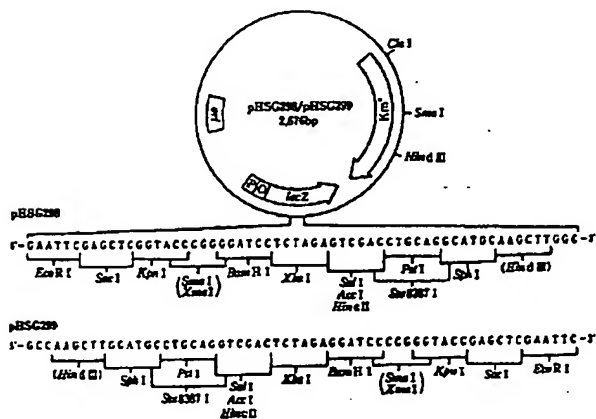
[Figure 3]

【図4】



[Figure 4]

【図5】



[Figure 5]

【図 6】

[Figure 6]

